

· 论著 ·

人乳头瘤病毒 16 型早基因 E6 /E7 编码区 序列变异研究 *

余南 **, 辜为为, 刘红娥, 孙洪青

(广州经济技术开发区医院生物中心实验室, 广东广州 510730)

【摘要】 目的 获取人乳头瘤病毒 16 型早基因 E6/E7 的编码区序列并进行变异分析, 为新型分子诊断方法的研发提供目标序列。 方法 通过导流杂交基因芯片技术获取人乳头瘤病毒 16 型感染宫颈脱落细胞。设计特异性引物, 扩增人乳头瘤病毒 16 型早基因 E6/E7 的编码区序列, 克隆后测序并对序列进行变异分析。 结果 通过导流杂交基因芯片技术进行宫颈脱落细胞的分型检测, 获得了人乳头瘤病毒 16 型感染阳性标本; 选择其中 3 份阳性标本核酸为模板, 通过特异性引物均成功扩增出大小介于 750 bp 和 1 000 bp 之间的目的序列; 分别克隆到 T 载体上并测序, 得到 3 条人乳头瘤病毒 16 型早表达基因 E6/E7 的编码区序列, 克隆并测序后向 GenBank 核酸数据库提交获收录, 登录号分别为 EU869316、EU869317 和 EU869318; 经 BLAST 分析, 3 条序列与 GenBank 序列 PPH16 (Accession: K02718) 的 E6/E7 编码区序列一致性均为 99%, 且存在 8 种碱基置换, 其中 4 种为同义突变, 另 4 种则可引起所编码的相应氨基酸残基改变。 结论 本研究得到了与 HPV 高危型 16 型 PPH16 高度相似的 E6/E7 编码序列, 为 HPV 致病机制和新型分子检测方法研究奠定了基础。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 早基因 E6/E7; 编码区序列; 变异

【中图分类号】 R37, R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2009)01-0001-03

[*Journal of Pathogen Biology*. 2009 Jan; 4(1): 1-3, 10.]

Variation of E6/E7 coding sequence derived from human papillomavirus type 16

YU Nan, GU Wei-wei, LIU Hong-e, SUN Hong-qing (*Guangzhou Economic and Technological Development District Hospital, Guangzhou 510730, China*)

【Abstract】 Objective To obtain coding sequences of E6/E7 from human papillomavirus (HPV) type 16 and analysis the variation distribution to develop a novel molecular diagnosis method for cervical cancer. **Methods** Flow-through hybridization and gene chips were applied in identification of HPV subtype and screen HPV type 16 positive samples from cervical epithelium samples. HPV type 16 E6/E7 coding sequences were amplified by PCR with the specific primers. The PCR products were purified and the target sequences were cloned into pMD18-T vectors and fragments were determined by sequencing analysis. Variation analyses were performed using align tools including BLAST. **Results** HPV type 16 positive samples were screened through flow-through hybridization from 500 cervical epithelium samples. Three of them were selected for E6/E7 coding sequence amplification. Each reaction produced one fragment with size between 750 bp and 1 000 bp. Three coding sequences of E6/E7 of HPV type 16 were cloned and sequenced. The 3 sequences had been submitted to GenBank, the assigned accession numbers are: EU869316, EU869317 and EU869318. By BLAST, all above 99% identities with corresponding coding region of PPH16 in GenBank. Among three sequences eight kinds variances and four of them would cause coding amino acid change. **Conclusion** E6/E7 coding sequences and their variation profiles of HPV type 16 from three women's cervical epithelium has been obtained. The sequences and interrelated analysis result will be helpful to the further research of HPV carcinogenesis mechanism and development of novel molecular detective methods.

【Key words】 Human papillomavirus; early gene E6/E7; coding sequence; variance

*** 宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病与人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染密切相关。在已鉴定出的 200 多种 HPV 基因型中, 主要高危型包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 和 82 等型。高危型 HPV 与宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌(cervical cancer, CC)关系密切, 其中 HPV 16 和

HPV 18 型尤为重要, 有报道称宫颈癌组织中 HPV 16 检出率最高^[1,2]。

* **【基金项目】** 广州市医药卫生科技基金资助项目 (No. 2007-YB-253); 广州经济技术开发区科技项目 (No. 2008Q-P055)。

** **【通讯作者(简介)】** 余南(1968-), 女, 江西人, 博士, 2005 年毕业于中山大学病原生物学专业。研究方向: 分子生物学与病原生物学。E-mail: yunan86@126.com

HPV 是一种无包膜嗜上皮 DNA 病毒, 基因组全长约 8 kb, 环状双链结构, 3 个功能区即早期、晚期转录区和上游调控区。早期转录区约 4 500 bp, 分别编码 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 等 6 个早期蛋白, 参与病毒的 DNA 复制、转录、翻译、调控和细胞转化等。其中 E6 和 E7 分别编码含有 151 和 98 个氨基酸残基的病毒原蛋白, 具有锌指结构, 是高危型 HPV 的主要转化蛋白, 可作用于抑癌基因 p53 和 Rb, 是 HPV 致癌作用中的重要因子^[3-9]。

本研究在宫颈癌临床诊断研究基础上, 通过导流杂交基因芯片技术筛选人乳头瘤病毒 16 型感染阳性宫颈脱落细胞标本, 用于扩增人乳头瘤病毒 16 型早基因 E6/E7 的编码区序列, 克隆、测序并对序列进行变异分析。

材料与方法

1 检测对象

为临床宫颈专科就诊的不同程度宫颈可疑病变病人。

2 试剂与仪器

导流杂交基因芯片 HPV 分型试剂为广东凯普公司产品(国药准字 S20060011); 引物由上海生工合成; TAQ 酶、pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品; DNA 胶纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)为 QIA-GEN 公司产品; 大肠埃希菌 JM 109 为本实验室保存, 感受态自行制备。ABI2700 热循环仪和 HybriMax 导流杂交仪为本实验室自备。

3 方法

3.1 标本的采集 由宫颈专科医生完成。扩阴器暴露宫颈口后, 棉拭子擦去分泌物, 宫颈刷顺时针刷转 3~5 圈后将宫颈刷密闭保存于样品管的保存液中。

3.2 DNA 模板的制备 标本制备过程在安全柜中进行。将样品管涡旋振荡后弃去宫颈刷, 取 500 μ l 宫颈细胞保存液, 14 000 r/min (离心半径 5.0~8.2 cm, 角转子角度 45°) 离心 5 min, 去上清, 加 400 μ l 溶液 I, 混匀后于恒温金属浴 100 °C 18 min, 加 400 μ l 溶液 II, 混匀, 室温静置 2 min, 14 000 r/min (离心半径 5.0~8.2 cm, 角转子角度 45°) 离心 5 min, 去净上清液, 在安全柜内敞口放置 10 min, 加 60 μ l 溶液 III 混匀后 3 000 r/min (离心半径 5.0~8.2 cm, 角转子角度 45°) 离心 5 min, -20 °C 保存备用。

3.3 分型检测 按每管 23.25 μ l Premix 和 0.75 μ l Taq 酶配制扩增反应液, 各加 1 μ l 模板溶液进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 9 min; 95 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增产物经变性后按试剂说明书进行导流杂交、酶标、显色, 显色结果根据判读模式图判读。

3.4 目的序列扩增 引物设计参考文献[7], 并做适当改变。上游引物 A1: 5'-ATA GAGCTC CGT AAC CGA AAT CGG -3'; 下游引物 A4: 5'-CAC GG-TACC TTA CAT CCC GTA CCC-3'。扩增反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将符合设计产物分子质量大小的电泳条带小心切割后, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 说明书的要求纯化, 纯化核酸溶液立即用于 T-A 克隆。

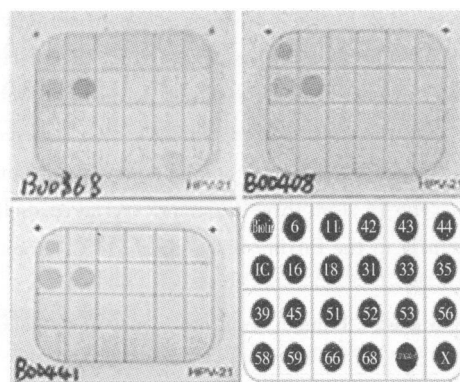
3.5 克隆与测序 根据 pMD18-T 产品说明书的要求进行目的 DNA 片段与 T 载体的连接, 反应条件为 16 °C 30 min。连接产物转移到预先制备的 100 μ l 大肠埃希菌 JM109 感受态细胞中进行转化, 冰水浴 30 min, 42 °C 热激 45 s, 再次冰水浴 1 min, 加 890 μ l 预热到 37 °C 的 SOC 培养基, 37 °C 150 r/min 培养 60 min, 涂布于含有 20 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜。次日挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆再次过夜摇菌后提取质粒, 进行双酶切鉴定。阳性菌进行测序鉴定。

3.6 序列分析 经过正反测序、序列拼接后得到的目的序列, 通过 BANKIT 工具向 GenBank 核酸数据库提交, 并与 GenBank 登录序列 PPH16 的 E6/E7 编码区序列进行比对。对出现的变异进行分析。

结果

1 HPV 分型检测

在 500 份筛查标本中 21 份分型检测为 HPV 16 型阳性。目的序列扩增所选择的 3 份阳性标本的导流杂交结果见图 1。



注: 右下图为判读示意图

图 1 3 个 HPV16 型阳性标本的导流杂交结果

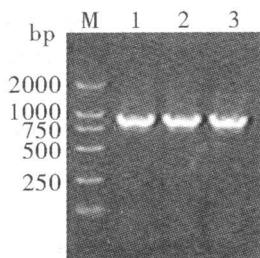
Note: The lower right map was the Schematic interpretation

Fig 1 The results of hybridization of the three positive samples of HPV type 16

2 目的序列扩增

扩增产物进行 1% 琼脂糖电泳后经 EB 染色, 3 个样品均成功得到分子质量在 750~1 000 bp 之间的扩

增产物(图2)。



M DNA 分子 DL2000 质量标准 1、2、3 编号为 B00368、B00408、B00441 的 3 个 HPV16 型阳性标本的扩增产物

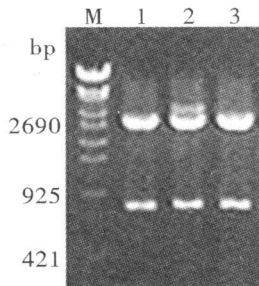
图2 目的序列的扩增结果

M DL2000 DNA marker 1、2、3 PCR products of three HPV type 16 positive samples of B00368, B00408 and B00441

Fig. 2 PCR products of target gene

3 克隆与鉴定

3 个样品均克隆得到阳性菌落,提取质粒后进行双酶切鉴定,均成功切出分子质量约 900 bp 的目的条带(图3)。



M λ -EcoT14 I digest 分子质量标准 1、2、3 编号为 B00368、B00408、B00441 的 3 个 HPV16 型阳性标本的重组质粒 BamHI 和 SalI 双酶切

图3 重组质粒的 BamHI 和 SalI 双酶切鉴定结果

M λ -EcoT14 I digest DNA marker 1、2、3 Recombinant plasmids from PCR products of B00368 B00408 and B00441 identified by double digestion results with BamHI and SalI

Fig. 3 Recombinant plasmids identified by double digestion of BamHI and SalI

4 测序与分析

4.1 核酸序列 HPV16 E6 基因全长 477 个核苷酸,从 83 位到 559 位,编码 151 个氨基酸。E7 基因组全长 297 个核苷酸,从 562 位到 858 位,编码 98 个氨基酸。对目的序列构建重组质粒正反测序、序列拼接后得到的目的序列为 881 bp,向 GenBank 核酸数据库提交并获收录,登录号分别为 EU869316、EU869317 和 EU869318;与 GenBank 登录序列 PPH16 (ACCESSION: K02718) 的 E6/E7 编码区序列进行比对,一致性均为 99%。3 条序列共发现 8 种碱基置换,其中 4 种为同义突变,另 4 种则可引起所编码的相应氨基酸残基改变。B00368、B00408 和 B00441 3 个样品的序列中均存在 G95A、C335T、C387T 和 T484C 4 个位点上的变异,其中 G95A 和 T484C 属同义突变,C335T 和 C387T 均可使所编码氨基酸残基发生改变(H85Y 和 P102L)。B00368 样品的相应序列还存在 A538T、

A600G 和 T761C,其中 A538T 和 A600G 属同义突变,T761C 则可使原编码的亮氨酸改变为丝氨酸(L67S)。B00408 样品的相应序列也存在 A538T,但未发现 A600G 和 T761C。B00441 样品的相应序列未发现 A538T、A600G 和 T761C,但存在 A487G,可引起所编码的异亮氨酸改变为甲硫氨酸(I135M)。上述变异中,G95A、C335T、C387T、T484C、A487G 和 A538T 发生于 E6 蛋白编码区,A600G 和 T761C 发生于 E7 蛋白编码区。

4.2 推断序列分析 利用 DNA STAR 分别得到 6 条序列的相应 E6 和 E7 推断序列。利用 ExPASy 的在线工具分析,其中 Compute pI/Mw tool 分析得到的 E6 推断序列 158AA 组成,理论等电点(Isoelectric point, pI) 9.15,分子质量单位为 19.2 ku。E7 推断序列 98AA,理论 pI 4.20,分子质量单位 11.0 ku。E6 推断序列的 MotifScan 得到的 Match 包括:1 个 CAMP 磷酸化位点(153~156),3 个 CK2 磷酸化位点(29~32、93~96 和 152~155),1 个 MYRISTYL 位点(64~69),3 个 PKC 磷酸化位点(140~142、149~151 和 152~154),1 个 TYR 磷酸化位点(79~86),1 个 LIM-DOMAIN(108~158),1 个 NLS-BP(4~18)。Hierarchical Neural Network(HNN)分析显示 E6 推断蛋白在 23~52、94~110、120~134 分布 α 螺旋(alpha helix),其余区域散在随机螺旋(random coil)。ProtScale 工具疏水性分析(OMH/SWEET et al)显示,H85Y 突变位于疏水区,且突变引起该区的疏水性分值下降。极性分析(polarity / zimmerman)结果与之一致,相应位置极性分值增加。

讨论

大量的宫颈癌致癌机理研究结果提示 HPV16 型的 E6、E7 蛋白宫颈癌的发生中起重要作用^[3-5,8]。E6、E7 蛋白作为功能蛋白,可结合和灭活 p53 和 Rb,使细胞周期调控失调,染色体不稳定,促进细胞永生。高危型 HPV 16 E6 和 E7 基因与宫颈癌关系密切。目前已有的 E6、E7 基因致癌机理的研究主要从抑制 p53、激活端粒酶、诱导细胞进入 S 期、使细胞永生以及抑制 IL-18 诱导的 IFN- γ 产生而逃避免疫监视等方面做了不少工作。

本研究对 HPV16 型早基因 E6/E7 的编码区序列进行克隆、测序并对序列进行变异分析,得到的 8 种碱基突变中有 4 种在 3 个样品中出现,提示广州东部可能存在出现频率较高的突变位点。所有得到的序列与碱基变异中,发生于 E6 编码区的 C335T 在不同地区的研究中出现,包括 Radhakrishna 等^[9]对印度地区和

(下转 10 页)

初次分离在血平板上 37 °C 培养 24 h 就能形成中等大小的菌落,说明该菌在 37 °C 生长较快,25 °C 培养沙保弱培养基 4 d 就能镜检出菌丝和小孢子,也能形成肉眼可见深入培养基内的菌丝,但一直未能检出组织荚膜胞浆菌典型的棘状大分生孢子,所以其生物学特性有待进一步研究,也是今后临床诊断组织荚膜胞浆菌病所需要注意的。

【参考文献】

- [1] 秦启贤 主编. 临床真菌学[M]. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 2001. 295—310.
- [2] Stephen AM. Laboratory diagnosis of histoplasmosis[J]. Clin Mi-

crobiol Newsletter, 1999, 21: 12.

- [3] George RT, Charles ELV, Dale EE. Unusual manifestation of histoplasmosis[J]. Dia Micro Infect Dis. 2004, 50: 33—41.
- [4] 桂希恩, 管立人. 内脏利什曼病、播散型组织胞浆菌病及马内菲青霉菌病的诊断和鉴别[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(01): 69—72.
- [5] 吴鄂生, 孙翊道, 赵蓓蕾, 等. 中南部阳、华东南京、西南成都组织胞浆菌感染流行病学调查[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(24): 50—52.
- [6] Sathapatayavongs B, Batteiger BE, Wheat J, et al. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks[J]. Medicine Baltimore, 1983, 62: 263—270.

【收稿日期】 2008-07-21 【修回日期】 2008-11-17

(上接3页)

任苗^[10]对四川地区 HPV 16 型 E6、E7 变异分析, Chan 等^[11]对香港妇女感染 HPV 16 型的型内变异分析, 以及 Ortiz 等^[12]对西班牙地区 HPV 16 型 E6 变异分析, 该处变异可使所编码的组氨酸改变为酪氨酸(H85Y)。杨英捷等^[13]报道北京地区 HPV 最常见的 T96G (D32E)和 A86G (N29S)在 HSIL 患者标本的检出率达 51.4%, 在非 HSIL 中也达 25.7%, 但本研究未发现两变异位点的存在, 得到的 8 种碱基置换在该报道及林逸飞等^[14]对深圳地区 HPV 的相应变异分析结果中均未出现。事实上, 本组实验数据所反映的高危型 HPV 的型别分布特征也与文献[13]报道的研究结果有很大差异(另文发表)。提示不同流行地区有不同 HPV 的分布特征。

Lee 等^[15]对 31 型 HPV 的 E6 蛋白进行了研究, 认为其 C 端的 PDZ 结构域结合模序(domain-binding motif)在致癌机制中作用重大。本研究在 16 型 HPV 也分析到了 C 端(108 ~ 158)存在 1 个 LIM-DO-MAIN。LIM 结构域包含 7 个保守的胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基, 这些保守残基按 C-x(2)-C-x(16, 23)-H-x(2)-[CH]-x(2)-C-x(2)-C-x(16, 21)-C-x(2, 3)-[CHD] 排布。LIM 结构域结合 2 价锌离子, 不直接结合 DNA, 但可作为蛋白间相互作用的介质, 在 E6 与 P53 的作用中可能起十分重要的作用。

本研究得到了与 HPV 高危型 16 型高度相似的 E6/E7 编码序列, 为下一步的致癌机理研究和新检测方法研发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Tsai HT, Wu CH, Lai HL, et al. A association between quantitative high-Risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk[J]. Cancer Epiderm Biomar Prev, 2005, 14(11): 2544—2549.
- [2] 巴瑞琪, 丁晓华. 宫颈癌变人乳头瘤病毒感染及型别分布的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2006, 35(6): 838—840.
- [3] Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16

E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887—5893.

- [4] Tsao SW, Mok SC, Fey EG, et al. Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs)[J]. Exp Cell Res, 1995, 218(2): 499—507.
- [5] Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Cancer Res, 1996, 56: 4620.
- [6] Boulet G, Horvath C, Vanden BD, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(11): 2006—2011.
- [7] Hu X, Pang T, Guo Z, et al. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma[J]. J Pathol, 2001, 195(3): 307—311.
- [8] Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells[J]. J Virol, 1991, 65(1): 473—478.
- [9] Radhakrishna PM, Sreevidya S, Pollock BH, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2002, 87(3): 268—273.
- [10] 任苗. 宫颈癌和癌前病变中人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 E7 基因特征分析[C]. 吉林大学硕士学位论文, 2007.
- [11] Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Human papillomavirus type 16 intratyphic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China[J]. J Infect Dis, 2002, 186(5): 696—700.
- [12] Ortiz M, Torres M, Munoz L, et al. Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1428—1434.
- [13] 杨英捷, 赵健, 廖秦平. 北京地区人乳头瘤病毒 16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(1): 32—34.
- [14] 林逸飞, 徐波. 宫颈癌组织中 HPV16E7 基因的结构变异及其意义[J]. 海南医学, 2006, 17(8): 172—173.
- [15] Lee C, Laimins LA. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31[J]. J Virol, 2004, 78(22): 12366—12377.

【收稿日期】 2008-08-04 【修回日期】 2008-11-14